

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

B.S.K.B.
Rijiro WATANABE et al
4-29-99
20-4559P
4 of 4
JCS25 U.S. PTO
09/30/766

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年12月10日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第351246号

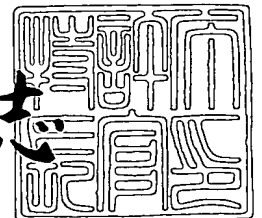
出願人
Applicant (s):

住友化学工業株式会社

1999年 3月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山建志



出証番号 出証特平11-3015439

【書類名】 特許願

【整理番号】 P149843

【提出日】 平成10年12月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 ラフィノース合成酵素遺伝子

【請求項の数】 23

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
社内

 【氏名】 渡辺 英二郎

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
社内

 【氏名】 大江田 憲治

【特許出願人】

 【識別番号】 000002093

 【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

 【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

 【識別番号】 100093285

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 久保山 隆

 【電話番号】 06-220-3404

【選任した代理人】

 【識別番号】 100094477

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 神野 直美

 【電話番号】 06-220-3404

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第120551号

【出願日】 平成10年 4月30日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701007

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ラフィノース合成酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号134から2467までの塩基で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する蛋白質をコードするDNAからなるラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 2】

配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 3】

配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号134から2467までの塩基で表される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 4】

配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 5】

配列番号4で示される塩基配列のうち塩基番号1から1719までの塩基で表される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 6】

請求項1～5記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有するDNA。

【請求項 7】

ハイブリダイゼーション法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを検出する方法であって、請求項6記載のDNAを標識しこれをプローブに用いて前記DNAを検出することを特徴とする方法。

【請求項 8】

ポリメラーゼチェインリアクション法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを増幅する方法であって、請求項1～5記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有するプライマーを用いて前記DNAを増幅することを特徴とする方法。

【請求項9】

ラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法であって、請求項7記載の方法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを検出し該DNAを回収する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項10】

ラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法であって、請求項8記載の増幅方法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを増幅し該DNAを回収する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項11】

請求項1～5記載のラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAまたは請求項6記載のDNAと、宿主細胞においてプロモーター活性を示すDNAとが連結されてなるDNA。

【請求項12】

請求項1～5記載のラフィノース合成酵素遺伝子または請求項6もしくは11記載のDNAを有するベクター。

【請求項13】

請求項1～5記載のラフィノース合成酵素遺伝子が宿主の細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項14】

請求項11記載のDNAが宿主の細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項15】

請求項12記載のベクターが宿主の細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項16】

宿主が微生物である請求項13～15記載の形質転換体。

【請求項17】

宿主が植物である請求項13～15記載の形質転換体。

【請求項18】

宿主がアブラナ科植物である請求項17記載の形質転換体。

【請求項19】

宿主がカラシナである請求項17または18記載の形質転換体。

【請求項20】

宿主がナタネである請求項17または18記載の形質転換体。

【請求項21】

請求項13～20記載の形質転換体を培養しラフィノース合成酵素を産生させることを特徴とするラフィノース合成酵素の製造方法。

【請求項22】

配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するラフィノース合成酵素。

【請求項23】

配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するラフィノース合成酵素。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ラフィノース合成酵素遺伝子等に関する。

【0002】

【従来の技術】

ラフィノース類オリゴ糖は、一般式として α -D-ガラクトピラノシル-(1→6)
 n - α -D-グルコピラノシル-(1→2)- β -D-フルクトフラノシドで示されるショ糖
の誘導体であり、 $n=1$ の場合にはラフィノース、 $n=2$ の場合にはスタキオース、 $n=$
3の場合にはベルバスコース、 $n=4$ の場合にはアジュコースと呼ばれる。

ラフィノース類オリゴ糖は、食品中に適量存在すると腸内細菌フローラの状態
を健全にする効果を示すことが知られている。このため、ラフィノース類オリゴ
糖は機能性食品素材として一部の食品に添加され、特定保健用食品分野において
利用され始めている。一方、ラフィノース類オリゴ糖は、ヒトなどの哺乳動物に
おいて消化・吸収されずに腸内細菌などの微生物により資化・分解されてガスと

なり、鼓腸や消化吸收阻害を引き起こす。従って、食品や飼料中のラフィノース類オリゴ糖の量は適量となるよう調節されることが望まれている

このようなラフィノース類オリゴ糖は、多くの植物においてショ糖を初発とするラフィノース類オリゴ糖生合成系により生成される。この生合成系は、通常、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基に、ガラクトキノール由来のガラクトシル基が α (1 \rightarrow 6)結合によって順次付加される反応により構成されている。該生合成系の最初の段階において、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基に、ガラクトキノール由来のD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させる反応に関与する酵素がラフィノース合成酵素である。該酵素は前記生合成系における律速段階となっていることが示唆されており、該酵素がラフィノース類オリゴ糖の生合成の制御に重要である。

そこで、植物のラフィノース生成量を増加または減少させるために、植物におけるラフィノース類オリゴ糖の生合成系を制御するには、ラフィノース合成酵素遺伝子を利用して植物中のラフィノース合成酵素の発現量や活性を制御する方法が有効である。しかしながら、このような方法に使用できるラフィノース合成酵素遺伝子の取得は未だ十分とは言い難い。

【0003】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、カラシナおよびナタネ由来のラフィノース合成酵素遺伝子を見出し、本発明に至った。

すなわち、本発明は、配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号134から2467までの塩基で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する蛋白質をコードするDNAからなるラフィノース合成酵素遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す。）、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素

遺伝子、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNA、該DNAをプローブに用いるハイブリダイゼーション法によるラフィノース合成酵素遺伝子の検出方法、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するプライマーを用いるポリメラーゼチェーンリアクション法によるラフィノース合成酵素遺伝子の増幅方法、前記検出方法または前記増幅方法を利用するラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法、本発明遺伝子を含むDNAと、宿主細胞においてプロモーター活性を示すDNAとが連結されてなるDNA、本発明遺伝子が宿主の細胞に導入されてなる形質転換体、該形質転換体を培養しラフィノース合成酵素を産生させることを特徴とするラフィノース合成酵素の製造方法、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するラフィノース合成酵素、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するラフィノース合成酵素を提供するものである。

【0004】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。なお、以下に記述された遺伝子工学的方法は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X、Current Protocols In Protein Science (1995), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-11184-8等の記載に準じて実施可能である。

【0005】

本発明遺伝子は、カラシナ、ナタネ等のアブラナ科植物から得ることのできる遺伝子であり、具体的には例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号134から2467までの塩基で表される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、配列番号2で示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、配列番号4で示される塩基配列のうち塩基番号1から1719までの塩基で表される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子、配列番号4で示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子等をあげ

ることができる。

【0006】

本発明遺伝子は、例えば、ビート等のアカザ科植物から下記の方法により得ることができる。

例えば、カラシナ(*Brassica juncea*)、ナタネ(*Brassica napus*)等のアブラナ科植物の組織を液体窒素中で凍結させた後、乳鉢などを用いて物理的に磨砕することにより細かい粉末状の組織片とし、該組織片から通常の方法によりRNAを抽出する。該抽出操作には、市販のRNA抽出キットを利用することができる。得られたRNA抽出液からエタノール沈澱によりRNAを回収し、このRNAから通常の方法によりポリA鎖を有するRNAを分画する。該分画操作には、市販のOligo dTカラムを利用することができる。このようにして得られたポリA鎖を有するRNAから通常の方法によりcDNAを合成する。該合成操作には、市販のcDNA合成キットを利用することができる。前記cDNAを鋳型として、配列番号2で示される塩基配列を基にして設計され化学合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCRを行なうことにより、DNAを増幅する。例えば、カラシナ(*Brassica juncea*)由来のcDNAを鋳型として、例えば、下記リスト1に示されるプライマー3と4を用いてPCRを行うことにより、本発明遺伝子である「配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子」、より具体的には「配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号1から2654までの塩基で表される塩基配列からなるラフィノース合成酵素遺伝子」のcDNAを増幅し取得することができる。この際に用いられるプライマーは、目的に応じて配列番号2で示される塩基配列を基にして設計し合成することができ、例えば、「配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子」のオープンリーディングフレーム領域をコードするDNA、すなわち「配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号134から2467までの塩基で表される塩基配列からなるラフィノース合成酵素遺伝子」のDNA（以下、本DNAと記す。）を増幅するには、下記リスト1のプライマー5と6で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成しプライマーに用いるとよい。

増幅されたDNAは「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」（

1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 「Current Protocols In Molecular Biology」 (1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてサブクローニングすることができる。具体的には、例えば、Invitrogen社のTAクローニングキットやStratagene社のpBluescriptIIなどのプラスミドベクターを用いてクローニングしてもよい。クローニングされたDNAの塩基配列の確認は、F.Sanger, S.Nicklen, A.R.Coulson著、Proceedings of National Academy of Science U.S.A. (1977), 74, 5463頁-5467頁等に記載されるダイデオキシターミネーティング法により行なうことができる。例えば、市販のパーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitなどを利用するとよい。

【0007】

(リスト1)

プライマー-1	TTGGAAGAGA AGACGCCGCC GGAATCGTC	30mer
プライマー-2	TTAAGCCCCG GCGAGAGCTC TGGCCGGACA	30mer
プライマー-3	ACCAATCCAA AATCTCATCA AATAATCGCA	30mer
プライマー-4	AAATAATAGG GGCAGTACAA ATTACACCAC	30mer
プライマー-5	ATGGCTCCAC CGAGCGTAAT TAAATCCGA	29mer
プライマー-6	CTAAAACTCA TACTTAATAG AAGACAAACC	30mer

【0008】

次いで、前記のようにして取得することができる本DNAを標識しこれをハイブリダイゼーション法におけるプローブとして例えばアブラナ科植物由来のDNAにハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合するDNAを検出することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを検出することができる。

アブラナ科植物由来のDNAとしては、例えば、カラシナ、ナタネ等のアブラナ科植物のcDNAライブラリーやgenomicDNAライブラリー等を使用することができる。このような遺伝子ライブラリーには、市販の遺伝子ライブラリーをそのまま用いることもできるし、また「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に

記載される通常のライブラリー作製法に従って作製されたライブラリーを用いることもできる。

ハイブリダイゼーション法としては、ブランクハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションをあげることができ、ライブラリーの作製に用いられたベクターの種類に応じて選択する。具体的には、使用されるライブラリーがファージベクターを用いて構築された場合には、まずライブラリーのファージを適当な宿主微生物と感染可能な条件下で混合して形質転換体を得た後、該形質転換体を軟寒天培地と混合し、寒天培地上にまく。その後適当な大きさのブランクが現れるまで37℃で培養を行う。また、使用されるライブラリーがプラスミドベクターで構築された場合には、まずライブラリーのプラスミドを適当な宿主微生物に導入し、形質転換体を得る。得られた形質転換体を適当に希釈して寒天培地にまき、適当な大きさのコロニーが現れるまで37℃で培養を行う。いずれのライブラリーの場合も上記の培養後、寒天培地の表面にメンブレンフィルターをのせ、ファージまたは形質転換体をメンブレンに転写する。このメンブレンをアルカリによる変性処理後、中和処理し、例えばナイロンメンブレンの場合には該メンブレンに紫外線を照射することにより、ファージまたは形質転換体のDNAをメンブレン上に固定する。次にこのメンブレンについて、通常の方法により標識された本DNAをプローブとして用いてハイブリダイゼーション法を行う。この方法については、例えば、D M Glover編「DNA cloning, a practical approach.」 IRL PRESS (1985) ISBN 0-947946-18-7を参考にするといよい。ハイブリダイゼーションを行う際の試薬及び温度条件は多種存在するが、一般的には例えば、プレハイブリダイゼーションは、プレハイブリダイゼーション溶液[6×SSC(0.9M NaCl, 0.09Mクエン酸)、0.1~1(w/v)%SDS、100 µg/ml変性サケ精巢DNA]にメンブレンを浸して65℃で1時間インキュベートする。次に、ここへ標識された本DNAを加えて混合し、42~68℃で4~16時間保温することによりハイブリダイゼーションを行う。尚、本発明において「ストリンジェントな条件」としては、前記のハイブリダイゼーションにおいて、例えば、65~68℃にて保温するような条件をあげることができる。ハイブリダイゼーション終了後メンブレンを取り出し、これを0.1~1(w/v)%SDSを含む2×SSCで洗浄し、さらに0.1~1(w/v)%SDSを含む0.2×S

SCですすいだ後乾かす。このメンブレンを、例えば、オートラジオグラフィーなどにより解析してメンブレン上のプローブの位置を検出することにより、用いたプローブと相同性のある塩基配列を有するDNAのメンブレン上の位置を検出することができる。このようにして検出されたDNAのメンブレン上の位置に相当するクローンをもとの寒天培地上で特定しこれを釣菌することにより、当該DNAを有するクローンを単離することができ、さらに、同様の検出操作を繰り返すことで当該DNAを有するクローンを純化することができる。

また、市販のGibcoBRL社のGENE TRAPPER cDNA Positive Selection Systemキットのような検出の方法を用いることもできる。この方法では、まず一本鎖化したDNAライブラリーとビオチン化した本DNA（プローブ）とをハイブリダイズさせた後、これにストレプトアビジン結合マグネットビーズを加えて混合し、この混合物からストレプトアビジン結合マグネットビーズを磁石で回収することで、本DNA、ビオチンおよびストレプトアビジンを介して該ビーズに結合した1本鎖DNA、すなわち、用いたプローブと相同性のある塩基配列を有する1本鎖DNAを回収する。尚、回収された1本鎖DNAは適当なオリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼを反応させることにより2本鎖化することができる。

【0009】

上記のように本DNAとハイブリダイズするDNAをアブラナ科植物由来の遺伝子ライブラリーのDNAから検出し、当該DNAを保有するクローンを純化して該クローンからファージまたはプラスミドDNAを単離することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを取得することができる。このようにして得られたDNAについて通常の方法により制限酵素地図を作成するかまたは塩基配列を決定することにより、本発明遺伝子を含むDNAを確認することができる。例えば、決定された塩基配列にコードされるアミノ酸配列が、配列番号1で示されるアミノ酸配列の111番目から213番目までのアミノ酸からなるアミノ酸配列と75%以上の相同性を有すること、配列番号1で示されるアミノ酸配列の260番目から275番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有すること、配列番号1で示されるアミノ酸配列の293番目から325番目までのアミノ酸からなるアミノ酸配列と70%以上の相同性を有すること、配列番号1で示されるアミノ

酸配列の609番目から695番目までのアミノ酸からなるアミノ酸配列と70%以上の相同性を有すること等から、本発明遺伝子であることを確認することができる。尚、ここで述べる相同性とは、比較する2つのアミノ酸配列間に類似性が見られる領域において、該領域全体のアミノ酸数に対して、2つのアミノ酸配列間で一致するアミノ酸の数が占める割合のことである。ここで、類似性が見られる領域のアミノ酸数は多い方が好ましい。例えば、このようなアミノ酸配列の相同性は、GENETIX(ソフトウェア開発株式会社製)などの遺伝子解析ソフトを用いることにより評価することができる。

【0010】

さらに、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNAをプローブとして上記と同様に所望の生物由来のDNAにハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合するDNAを検出することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを検出する(以下、本発明検出方法と記す。)ことができる。ここで用いられる本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNAは、例えば、配列番号2または配列番号4で示される塩基配列に基づいて通常の方法で化学合成してもよく、また、配列番号2または配列番号4で示される塩基配列に基づいて通常の方法で化学合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCR法により調製してもよい。

【0011】

本発明遺伝子の部分塩基配列を有するプライマーを用いるPCR法により、所望の生物由来のDNAからラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNAを増幅する(以下、本発明増幅方法と記す。)ことが可能である。

具体的には、例えば、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを設計し、通常の方法によりこれを化学合成する。オリゴヌクレオチドの長さとしては、一般的に、アニーリングの特異性が確保される点からは塩基数が多い方がよく、プライマー自身が高次構造を取り易くアニーリング効率が悪くなる恐れがある点や合成後の精製時に煩雑な操作が必要となる点からは塩基数が多すぎない方がよく、通常、塩基数が15以上50以下が好ましい。このとき、コドン表(図1)に基づき、1つのアミノ酸をコードしうるコドンのバリエーションに応

じて、プライマーの特定の位置の残基の合成に複数の塩基の混合物を使用し、該残基が異なる塩基からなるプライマーの混合物を合成することもできる。また、例えば、複数の塩基と対合できるイノシンなどの塩基を、前記の複数の塩基の混合物の代わりに用いることもできる。尚、ここで、2本鎖DNAからなる本発明遺伝子のコーディング鎖と同じ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをセンスプライマー、該コーディング鎖の塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをアンチセンスプライマーと呼ぶ。

本発明遺伝子のコーディング鎖の5'上流側の塩基配列を有するセンスプライマーと、3'下流側の塩基配列と相補的な塩基配列を有するアンチセンスプライマーとを組み合わせ用いて、例えば、遺伝子ライブラリー、ゲノムDNAまたはcDNAを鋳型としてPCR反応を行いDNAを増幅する。ここで用いられる遺伝子ライブラリーとしては、例えば、カラシナ、ナタネなどのアブラナ科植物等のcDNAライブラリーやgenomicDNAライブラリー等をあげることができる。該遺伝子ライブラリーとしては、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常のライブラリー作製法に従って作製されたライブラリーを用いることもできるし、また市販の遺伝子ライブラリーをそのまま用いることもできる。ゲノムDNAまたはcDNAとしては、例えば、アブラナ科植物等から調製されたgenomicDNAやcDNAをあげることができる。例えば、上記のリスト1に示されるプライマー1と2とを用いてカラシナ由来のcDNAを鋳型としてPCRを行うことにより、配列番号2の塩基番号749~1215で示される塩基配列を有するDNAを増幅することができ、該プライマーを用いてナタネ由来のcDNAを鋳型としてPCRを行うことにより、配列番号4の塩基番号1~467で示される塩基配列を有するDNAを増幅することができる。このようにして増幅されたDNAは通常の電気泳動法により確認することができ、該DNAは、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてクローニングすることができる。該D

NAについて通常の方法により制限酵素地図を作成するかまたは塩基配列を決定することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子またはその一部を含むDNAを確認することができる。該DNAがラフィノース合成酵素遺伝子の一部を含む場合は、その塩基配列に基づき、該塩基配列の5'末端より上流の塩基配列を含むDNA、または該塩基配列の3'末端より下流の塩基配列を含むDNAの増幅をPCR法で行うことができる。すなわち、上記のようにして得られたDNAの塩基配列に基づいて、5'末端側上流部分の増幅にはアンチセンスプライマーを、3'末端側下流部分の増幅にはセンスプライマーをそれぞれ設計し合成する。これらのプライマーを用いて、例えば、Clontech社のMarathon Kit等の市販のキットを用いてRACE法を行うことにより、ラフィノース合成酵素遺伝子の既得部分の5'末端より上流、または、既得部分の3'末端より下流の塩基配列を明らかにすることができる。このようにして明らかにされた塩基配列に基づいて、完全長のラフィノース合成酵素遺伝子の末端部分の塩基配列からなるプライマーを合成し再度PCRを行うことにより、完全長のラフィノース合成酵素遺伝子を取得することができる。

【0012】

上述の本発明検出方法をアブラナ科植物等の遺伝子型の解析に利用してもよい。具体的には、例えばアブラナ科植物由来のゲノムDNAを、例えば、渡辺格監修、杉浦昌弘編集：「クローニングとシークエンス(植物バイオテクノロジー実験マニュアル)」、農村文化社、東京(1989)などに記載された通常の方法に従って調製し、少なくとも数種類の制限酵素で切断し電気泳動した後、泳動されたDNAを通常の方法に従ってフィルターにブロットイングする。このフィルターに、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNAから通常の方法で調製されたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行ない、該プローブがハイブリダイズするDNAを検出する。検出されたDNAの長さを異なる品種について比較し、その長さの違いから、品種間のラフィノース類オリゴ糖発現に伴う表現形質の差を解析することができる。また、上記の方法により検出されたDNAの長さを遺伝子組換え植物と同種の非遺伝子組換え植物とで比較してもよい。遺伝子組換え植物において非遺伝子組換え植物よりもハイブリダイズするバンドが数多くまたは濃く検出された場合、該植物が遺伝子組換え植物であると判別することができる。この方法は

、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコール」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7、90-94頁に記載されるRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法に準じて行なうことができる。

【0013】

また、本発明増幅方法をアブラナ科植物等の遺伝子の解析に利用してもよい。具体的には、例えば、アブラナ科植物から調製した植物ゲノムDNAを鋳型として、本発明増幅方法を行ない、DNAを増幅させる。増幅されたDNAをホルムアルデヒド溶液と混合し、85℃で5分間加熱変性処理を行った後、氷上で急冷する。このサンプルをグリセロールを0(v/v)%または10(v/v)%含む、例えば6(w/v)%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動に供する。この電気泳動には市販のSSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)用の電気泳動装置を用いることができ、例えば5℃、25℃、37℃等にゲルの温度を一定に保って電気泳動を行なう。電気泳動したゲルから、例えば、市販の試薬による銀染色法等の方法によりDNAを検出する。検出されたDNAの電気泳動における挙動の品種間の差からラフィノース合成酵素遺伝子内の変異を検出し、該変異に基づいて生じる、ラフィノース類オリゴ糖発現に伴う表現形質における品種間の差を解析する。この方法は、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコール」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7、141-146頁に記載されるSSCP法に準じて行うことができる。

【0014】

上述の本発明検出方法または本発明増幅方法によるアブラナ科植物の遺伝子解析法は、植物品種のラフィノース類オリゴ糖生合成に伴う表現形質の差の解析のみに有効なだけでなく、例えばアブラナ科植物の新品種の作出の際に目的の形質を持つクローンの選択にも利用できる。また、組換え体植物を利用して品種作出を行う場合に、作出されたクローンが組換え体植物由来の形質を保持しているか否かの判別にも利用できる。

【0015】

本発明遺伝子を宿主の細胞で発現させるには、本発明遺伝子とプロモーターとが連結されてなるDNA（以下、本発明発現DNAと記す。）を利用するとよい

。該DNAにおいてプロモーターは、該DNAが導入され形質転換される宿主の細胞内で機能可能なものであれば特に制限はない。例えば、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、大腸菌のトリプトファンオペロンのプロモーター、tacプロモーター等の大腸菌内で機能可能な合成プロモーター、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (ADH) プロモーター、アデノウイルス・メジャーレート (Ad.ML) プロモーター、SV40の初期プロモーター、バキュロウイルスプロモーターなどがあげられる。また、宿主が植物である場合には、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子 (NOS) プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子 (OCS) プロモーターなどのT-DNA由来の構成型プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の19S及び35Sプロモーターなどの植物ウイルス由来のプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ (CHS) 遺伝子のプロモーター、Pathogenesis-related protein (PR) 遺伝子のプロモーターなどの誘導プロモーターなどをあげることができる。また、特定の植物組織で特異的に発現するようなプロモーター、例えば、ダイズ由来種子貯蔵蛋白質グリシニン遺伝子のプロモーターを持つベクターpSUM-GY1 (特開平06-189777) などを使用することもできる。

さらに、本発明発現DNAにターミネーターを連結させてもよい。この場合、発現させようとするラフィノース合成酵素遺伝子の下流にターミネーターが位置するように連結すると一般的によい。用いられるターミネーターは、形質転換される宿主の細胞内で機能可能なものであれば特に制限はないが、例えば宿主が植物の場合には、ノパリン合成酵素遺伝子 (NOS) ターミネーターなどのT-DNA由来の構成型ターミネーター、ニンニクウイルスGV1、GV2のターミネーターなどの植物由来のターミネーターなどをあげることができる。

【0016】

かかる本発明発現DNAを通常の遺伝子工学的方法に準じて宿主の細胞に導入することにより形質転換体を得ることができる。尚、宿主の細胞に導入するための形質転換方法に応じて、必要であれば、本発明発現DNAを適当な選抜マーカー遺伝子を有するベクターに挿入して使用するとよい。

本発明発現DNAが挿入されたベクターは、例えば、宿主が微生物の場合には

、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常的手段により微生物に導入することができ、該ベクターにより形質転換された微生物は抗生物質耐性や栄養要求性等の選抜マーカーにより選抜される。選抜された微生物、例えば形質転換大腸菌などで誘導型のプロモーター、例えばtacプロモーターなどの下流に本発明遺伝子を翻訳可能な形で結合してある場合には通常の培養、誘導条件下で本発明遺伝子の翻訳産物を発現させ、ペプチド、あるいは蛋白質として回収することが可能である。

このようにして調製される本発明遺伝子の翻訳産物について、例えば、L. Lehle and W. Tanner, Eur. J. Biochem., 38, 103頁-110頁(1973)に記載される方法によりラフィノース合成活性を測定することにより、該翻訳産物が「ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力」を有するか否かを判定することができる。具体的には、例えば、本発明遺伝子をpGEX-4T3(Pharmacia社)またはpGEX-4T3(Pharmacia社)にクローニングし、本発明発現DNAを保有するプラスミドを得る。得られたプラスミドを例えば大腸菌HB101株に導入し、形質転換株を得る。得られた形質転換株の終夜培養液1mlを100mlのLB培地に植菌し、37℃で約3時間培養した後、終濃度1mMのIPTG(isopropylthio- β -D-galactoside)を添加し、さらに5時間培養する。該培養液から遠心分離により菌体を回収し、得られた菌体に菌体重量の10倍量の100mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA、5mM DTT(Dithiothreitol)、1mM PMSF(Phenylmethylsulfonyl fluoride)、1mM benzamideを加え、懸濁する。この懸濁液を超音波破碎機(Branson社)で超音波処理し、菌体を破碎する。得られた菌体破碎液を遠心分離し、可溶性蛋白質溶液を回収する。得られた蛋白質溶液を、終濃度で100mM Tris-HCl(pH7.4)、5mM DTT(Dithiothreitol)、0.01% BSA、200 μ M sucrose、5mM ガラクチノール、31.7 μ M [14 C] sucroseとなる反応液に加える。該反応液を37℃で保温した後、これに1.5倍容のエタノールを加えて攪拌する。不溶物を遠心分離により除いた後、上清を例えばHPTLCセルロース薄層クロマトプレート(Merck社HPTLC plates ce

llulose)にスポットし、n-ブタノール：ピリジン：水：酢酸=60：40：30：3で展開する。展開したプレートを乾燥した後、イメージングアナライザー(富士フイルム社FUJIXバイオ・イメージングアナライザーBAS-2000II)で分析し、生成した $[^{14}\text{C}]$ ラフィノースを定量することでラフィノース合成活性を測定することができる。

また、前述のようにして調製した翻訳産物は、抗体を作製する際の抗原として用いることもでき、このようにして調製された抗体は、例えば植物などの生物から調製した粗蛋白質抽出物中における本発明遺伝子の翻訳産物の検出・定量に用いることもできる。

【0017】

宿主が植物の場合には、本発明発現DNAが挿入されたベクターは、アグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917および特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887および特開平5-68575)、またはパーティクルガン方法(特開平5-508316および特開昭63-258525)などの通常の手段により植物細胞に導入することができる。該ベクターの導入により形質転換された植物細胞は、カナマイシンまたはハイグロマイシン等の抗生物質耐性などの選抜マーカーにより選抜される。このようにして形質転換された植物細胞から、例えば内宮著、「植物遺伝子操作マニュアル(トランスジェニック植物の作り方)」1990年、講談社サイエンティフィック(ISBN4-06-153513-7)、27-55頁に記載される通常の植物細胞培養方法により形質転換体植物を再生させることができる。さらに、得られた形質転換体植物から種子を得ることにより該形質転換体植物の増殖を行うこともできる。また、得られた形質転換体植物と非形質転換体植物とを交雑することで該形質転換体の形質をもつ子孫植物を作製することもできる。

【0018】

例えば、アブラナ科植物における遺伝子導入には基本的に上記の一般的手法が適用できる。具体的には例えば、J. Fry, A. Barnason, R. B. Horsch著、"Transformation of Brassica napus with Agrobacterium tumefaciens based vectors"、Plant Cell Reports (1987), 6, 321頁-325頁に記載される遺伝子導入法に準じて実施が可能である。

例えば、アグロバクテリウム法による遺伝子導入を行う場合、まず、先に述べた本発明発現DNAをバイナリーベクターに挿入する。得られたベクターは例えば、塩化カルシウム処理でcompetentな状態にした*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404株などに導入することができる。導入されたベクターが有する選抜マーカー遺伝子に応じた選抜方法により、例えば選抜マーカー遺伝子がカナマイシンなどの抗生物質に対する耐性を付与する遺伝子である場合は該抗生物質を含む培地でベクター導入株を培養することにより、形質転換体を選抜することができる。得られたアグロバクテリウムの形質転換体は例えばLB培地などの液体培地で培養し、増殖させることができる。

このように調製したアグロバクテリウムの形質転換体の培養液を用いて、以下に記載されるような方法によりアブラナ科植物を形質転換することができる。例えば、ナタネ、またはカラシナの種子を例えば2% sucrose、0.7% agarを含む1/2 MS培地に無菌播種する。約1週間後、発芽した植物の子葉と葉柄を無菌的にメスで切り取り、例えば3% sucrose、0.7% agar、 $4.5\mu\text{M}$ BA、 $0.05\mu\text{M}$ 2,4-D、 $3.3\mu\text{M}$ AgNO_3 を含むMS培地に移し、1日間培養する。このようにして前培養した子葉と葉柄とを、上記のアグロバクテリウムの培養液の1000倍希釈液に移し、5分間放置する。この子葉と葉柄を前培養と同じ培地に再び移し、3から4日間程度培養する。培養した子葉と葉柄は例えば3% sucrose、 $4.5\mu\text{M}$ BA、 $0.05\mu\text{M}$ 2,4-D、 $3.3\mu\text{M}$ AgNO_3 、500mg/l cefotaximを含むMS培地に移し、1日間振盪して除菌する。除菌した子葉と葉柄は例えば3% sucrose、0.7% agar、 $4.5\mu\text{M}$ BA、 $0.05\mu\text{M}$ 2,4-D、 $3.3\mu\text{M}$ AgNO_3 、100mg/l cefotaxim、20mg/l カナマイシンを含むMS培地に移し、3から4週間培養する。次に子葉と葉柄を例えば3% sucrose、0.7% agar、 $4.5\mu\text{M}$ BA、 $0.05\mu\text{M}$ 2,4-D、100mg/l cefotaxim、20mg/l カナマイシンを含むMS培地に移し、培養する。この培地での培養を、3から4週間毎に植え継ぎしながら継続する。シュートが再生してきたら、シュートを例えば3% sucrose、0.7% agar、20mg/l カナマイシンを含むMS培地に植え継ぎ、3から4週間培養する。植物体が発根したら、例えばバーミキュライト:ピートモス=1:1に移し、21から22℃で12時間:12時間=昼/夜の条件で培養することにより馴化する。植物体の成長に伴い、適宜培養土に移して栽培する。再生した植物体の葉から上記の方法に従ってゲ

ノムDNAを抽出し、本発明発現DNAの部分塩基配列を有するプライマーを用いたPCRを行なうことにより、本発明遺伝子の植物体ゲノムへの挿入を確認することができる。

【0019】

本発明遺伝子を上記のように植物、例えばアブラナ科植物に導入し発現させることにより、植物におけるラフィノース合成酵素の発現量や活性を変化させることができ、該植物のラフィノース類オリゴ糖含量が制御され得る。本発明遺伝子は、遺伝子の相同性に基づいてアブラナ科植物のラフィノース合成酵素の発現量や活性を変化させる技術、例えば相同組換えやアンチセンス技術、コサプレッション等の技術において有用である。

【0020】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

【0021】

実施例1 (cDNAの作成)

カラシナ(*Brassica juncea*)の葉約2gを液体窒素で凍結し、乳鉢で粉碎した。Isogen(ニッポンジーン社)を20ml加え、さらに良くすりつぶした。該破碎物を遠心管に移し、4mlのクロロホルムを加え、ボルテックスで攪拌した後、これを4℃で6, 500 x g、10分間遠心分離し、水層を回収した。回収された水層に10mlのイソプロパノールを加えて攪拌した後、4℃にて6, 500 x g 10分間遠心分離した。得られた沈殿を10mlの70%エタノールで洗浄した後、これを180 μ lのDEPC-処理済み滅菌水で溶解した。該溶解物を55℃で5分間おいた後、該溶解物に10 μ lの5M NaClを加えた。得られた溶液はBIOMAG mRNA PURIFICATION KIT(PerSeptive Biosystems社:Catalog No. 8-MB4003K)を用いて精製した。

得られたmRNA溶液に3M酢酸ナトリウムとエタノールを加え、RNAをエタノール沈澱し、これを回収した。回収されたRNAを70%エタノールで2回洗浄し、これを20 μ lの滅菌水に溶解し、cDNA合成に用いた。得られたRNAは260nmの吸光度を測定し、定量した。

cDNA合成には、Clontech社のSMART PCR cDNA Synthesis Kitを用い、すべての操作はキットに添付のプロトコールに従った。

ナタネWestar(*Brassica napus*)の未熟種子からも上記と同様にしてmRNAを精製し、cDNA合成を行った。

【0022】

実施例2 (ラフィノース合成酵素遺伝子の単離とその塩基配列の解析)

下記リスト2で示される塩基配列からなるDNAプライマーを合成した。PCRは、Clontech社のAdvantage KlenTaq cDNA Kitを用いてパーキンエルマー社のGene Amp PCR Systems 2400とDNA Thermal Cycler Model 480で行なった。上記プライマーを用い、実施例1により得られたカラシナのcDNAを用いてPCR反応を行った。反応は94℃1分間、次いで50℃3分間、さらに72℃3分間の保温を1サイクルとして、この反応を40サイクル行った。反応産物をアガロースゲル電気泳動で分析した。その結果、約1.2kbのバンドの増幅が検出された。増幅されたDNAをTAクローニングキット(Invitrogen社)でクローニングし、パーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitを用いてシークエンス反応を行ない、ABI社373S DNA シークエンサーで塩基配列の解析を行った。その結果得られた塩基配列をもとにリスト3で示される塩基配列からなる合成DNAプライマーを作成し、実施例1で得られたカラシナ(*Brassica juncea*)とナタネWestar(*Brassica napus*)のcDNAを用いて上記と同様のPCRを行った。その結果、最終的にカラシナ(*Brassica juncea*)のcDNAから配列番号2の塩基番号749~1215で示される塩基配列が、ナタネWestar(*Brassica napus*)のcDNAから配列番号4の塩基番号1~467で示される塩基配列が明らかになった。

【0023】

(リスト2)

#1 35mer

CGATTIAAIG TITGGTGGAC IACICAITGG GTIGG

#10RV 38mer

CAITGIACCA TITGICAICC ITGIA(AG)CCAI TAIGTICC

【0024】

(リスト3)

primer-1 30mer
GTTAGGGTTC ATATGAACAC CTTCAAGCTC

primer-2RV 26mer
CAACGGCGAG ATCTTGCATC GTCAAC

【0025】

実施例3 (ラフィノース合成酵素遺伝子の全長塩基配列の解析)

実施例2で得られた塩基配列に基づき、下記リスト4で示される塩基配列からなるDNAプライマーを合成した。実施例1と同様の操作によりカラシナ(*Brassica juncea*)とナタネWestar(*Brassica napus*)の葉から得られたcDNAを、リガーゼによりClontech社のMarathon Kitに含まれるアダプターと結合した。このようにして調製したアダプターが結合されたcDNAを用いて、リスト4に示されるプライマーによるPCRを行った。5'-末端の塩基配列の解析には、B-2RV、B-3RV、B-4RV primerを、3'-末端の塩基配列の解析にはB-1、B-8、B-7、B-6 primerを用いた。この塩基配列の解析はClontech社のMarathon Kitのプロトコールに準じて行った。その結果、カラシナ(*Brassica juncea*)からは配列番号2で示される配列が、ナタネWestar(*Brassica napus*)からは配列番号4で示される配列が明らかとなった。

【0026】

(リスト4)

B-2RV 30mer
GGATTCGACA CAAACCGCCA CGTCATCGTC

B-3RV 27mer
CCACGTGCAC CACCCGAACT TATCGAC

B-4RV 30mer
AACATCGATA CCATCGGAGT CATGTCCAAT

B-1 30mer
GTTAGGGTTC ATATGAACAC CTTCAAGCTC

B-8 29mer

TCTACGTCTG GCACGCGCTT TCGGCTAC

B-7 31mer

GTTGACGTCA TCCACATATT GGAGATGTTG T

B-6 29mer

GTTATCGCTA GCATGGAGCA CTGTAATGA

【0027】

実施例4 (カラシナ由来のラフィノース合成酵素遺伝子の植物での発現ベクターの構築)

実施例3で得られたカラシナ由来のラフィノース合成酵素遺伝子の塩基配列に基づいてリスト5で示される塩基配列のDNAプライマーを合成した。PCRは実施例2と同様にカラシナのcDNAを用いて行った。増幅されたDNAをSacIで切断し、同じくSacIで切断したベクターpBI121(-)と前記DNAとを、Ligation Kit(宝酒造社)を用いてライゲーションした。ベクターpBI121(-)は、プラスミドpBI121(Clontech社)をBamHIとSacIとで切断し、リスト6で示される塩基配列からなるリンカーとライゲーションして作製した。得られたベクターは、制限酵素の切断地図と、リスト7で示される塩基配列からなるプライマーを用いたPCRにより分析し、ラフィノース合成酵素遺伝子の挿入方向について確認した。カラシナ由来のラフィノース合成酵素遺伝子のオープンリーディングフレームが、ベクターの35Sプロモーターに対して転写可能な方向に挿入されたベクターをBjRS-Sac(+)-121と名づけ、逆方向に挿入されたベクターをBjRS-Sac(-)-121と名づけた。

【0028】

(リスト5)

SacI-BjN 35mer

AACGAGCTCA ATCCAAAATC TCATCAAATA ATCGC

SacI-BjintrV 25mer

ACAATAGTTG AGGGCGGAAG AGTAG

【0029】

(リスト6)

BamSac-(+)linker 25mer

GATCGAGCTCGTGTCGGATCCAGCT

BamSac-(-)linker 17mer

GGATCCGACACGAGCTC

【0030】

(リスト7)

35S-3 30mer

CCTCCTCGGA TTCCATTGCC CAGCTATCTG

B-2RV 30mer

GGATTCGACA CAAACCGCCA CGTCATCGTC

B-8 29mer

TCTACGTCTG GCACGCGCTT TGGCGCTAC

【0031】

実施例5 (カラシナラフィノース合成酵素遺伝子によるカラシナの形質転換)

実施例4で作製したベクターBjRS-Sac(+)-121とBjRS-Sac(-)-121を用いてアグロバクテリウム感染方法によりカラシナ(*Brassica juncea*)の形質転換を行った。

実施例4で作製した2種類のプラスミドBjRS-Sac(+)-121とBjRS-Sac(-)-121各々によって、あらかじめ塩化カルシウム処理でcompetentな状態にした*Agrobacterium tumefaciens*(LBA4404株:リファンピシン、ストレプトマイシン耐性)を形質転換した。形質転換体は、導入されたプラスミドが有するカナマイシン耐性遺伝子(neomycin phosphotransferase:NPTII)により付与されるカナマイシンに対する耐性の形質を利用してリファンピシン50 μ l/ml、カナマイシン25 μ l/mlを含むLB培地で選択することにより得られた。

得られたアグロバクテリウムの形質転換体(*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404株:Rif^R, Sm^R)をリファンピシン50 μ l/ml、カナマイシン25 μ l/mlを含むLB培地で28℃で一昼夜培養し、得られた菌液を以下に記載される方法によるカラシナの形質転換に用いた。

カラシナ種子を2% sucrose、0.7% agarを含む1/2MS培地に無菌播種した。1週間後、発芽した植物の子葉と葉柄をメスで切り取り、3% sucrose、0.7% agar、4

.5 μ M BA、0.05 μ M 2.4-D、3.3 μ M AgNO₃を含むMS培地に移し、1日間前培養した。このように前培養した子葉と葉柄を、上記のアグロバクテリウムの培養液の100倍希釈液に移し、5分間放置した。この子葉と葉柄を前培養と同じ培地に再び移し、3から4日間培養した。培養した子葉と葉柄は3% sucrose、4.5 μ M BA、0.05 μ M 2.4-D、3.3 μ M AgNO₃、500mg/l cefotaximを含むMS培地に移し、1日間振盪しながら除菌した。除菌した子葉と葉柄は3% sucrose、0.7% agar、4.5 μ M BA、0.05 μ M 2.4-D、3.3 μ M AgNO₃、100mg/l cefotaxim、20mg/l カナマイシンを含むMS培地に移し、3から4週間培養した。次に子葉と葉柄を3% sucrose、0.7% agar、4.5 μ M BA、0.05 μ M 2.4-D、100mg/l cefotaxim、20mg/l カナマイシンを含むMS培地に移し、培養した。3から4週間毎に植え継ぎしながらこの培地での培養を継続した。シュートが再生してきたら、シュートを3% sucrose、0.7% agar、20mg/l カナマイシンを含むMS培地に植え継ぎ、3から4週間培養する。植物体が発根したらこれをバーミキュライト:ピートモス=1:1に移し、21から22℃で12時間:12時間=昼/夜の条件で培養する。植物体の成長に伴い、培養土で栽培する。

【0032】

(配列の簡単な説明)

1. 配列番号1:

配列番号1で示される配列は、カラシナより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子にコードされるラフィノース合成酵素蛋白質のアミノ酸配列を示す。

2. 配列番号2:

配列番号2で示される配列は、カラシナより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子のcDNAの塩基配列を示す。

3. 配列番号3:

配列番号3で示される配列は、ナタネより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子にコードされるラフィノース合成酵素蛋白質のアミノ酸配列を示す。

4. 配列番号4:

配列番号4で示される配列は、ナタネより取得されたラフィノース合成酵素遺伝子のcDNAの塩基配列を示す。

5. リスト 1 :

リスト 1 に示される配列のうち、プライマー 1 と 2 は、ラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有する DNA の増幅に用いられるプライマーの塩基配列の一例を示す。プライマー 1 はカラシナ及びナタネ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有する DNA を増幅するためのセンスプライマー、プライマー 2 はアンチセンスプライマーである。目的に応じて適当にこれらの塩基配列の 5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を加えることができる。

プライマー 3 と 4 は、カラシナのラフィノース合成酵素遺伝子の cDNA の増幅に用いられるプライマーの塩基配列の一例を示す。プライマー 3 と 4 はいずれもラフィノース合成酵素遺伝子の非翻訳領域の塩基配列に基づいている。プライマー 3 はカラシナ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の cDNA の 5'-末端非翻訳領域に相当するセンスプライマー、プライマー 4 は 3'-末端非翻訳領域に相当するアンチセンスプライマーである。

プライマー 5 と 6 はカラシナのラフィノース合成酵素遺伝子の cDNA のラフィノース合成酵素蛋白質のアミノ酸配列をコードしているオープンリーディングフレームの増幅に用いられるプライマーの塩基配列の一例を示す。プライマー 5 は前記オープンリーディングフレームの 5'-末端領域に相当するセンスプライマー、プライマー 6 は 3'-末端領域に相当するアンチセンスプライマーである。目的に応じて適当にこれらの塩基配列の 5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を加えることができる。

6. リスト 2 :

リスト 2 に示される配列は、カラシナのラフィノース合成酵素遺伝子の cDNA 塩基配列の解析の際に用いたプライマーの塩基配列を示す。I はイノシンを示す。また、括弧で括られた塩基はこれらの混合物を DNA 合成の際に用いたことを示す。なお、プライマー番号の後に記載の「RV」はこのプライマーがアンチセンスの配列であることを示す。

7. リスト 3 :

リスト 3 に示される配列は、カラシナのラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列に基づいて合成されたプライマーである。プライマー番号の後に記載の「

RV」はこのプライマーがアンチセンスの配列であることを示す。

8. リスト4:

リスト4に示される配列は、カラシナとナタネのラフィノース合成酵素遺伝子の塩基配列の解析に用いられたプライマーである。プライマー番号の後に記載の「RV」はこのプライマーがアンチセンスの配列であることを示す。

9. リスト5:

リスト5に示される配列はカラシナ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の5' 上流部分の増幅に用いられたプライマーである。SacI-BjNは配列番号2における塩基番号4から29で示される塩基配列にSacI認識配列を付加した塩基配列からなるプライマーである。SacI-BjintRVは配列番号2における塩基番号1164から1188に相当する塩基配列からなるアンチセンスプライマーである。

10. リスト6:

リスト6に示される配列は、カラシナcDNAに付加したアダプターの塩基配列を示す。これらの合成DNAは相補鎖のため、混合することで二本鎖DNAとなる。このアダプターは両端に制限酵素BamHIとSacIの切断部位の付着末端を有し、二本鎖DNA領域にBamHIとSacIの認識配列を持つ。

11. リスト7:

リスト7に示される配列は、ベクターにクローニングしたカラシナ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の挿入方向の確認に用いたプライマーである。35S-3は35Sプロモーターに対するセンスのプライマーである。B-2RVは配列番号2の塩基番号593から622までに示される塩基配列からなるアンチセンスプライマー、B-8は配列番号2の塩基番号1110から1138までに示される塩基配列からなるセンスプライマーである。

【0033】

【発明の効果】

本発明により、ラフィノース合成酵素の植物における発現量や活性を変化させる技術に利用可能なラフィノース合成酵素遺伝子等を提供することが可能となる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Chemical Company Limited

<120> Raffinose synthetase genes

<130> P149843

<150> JP 10/120551

<151> 1998-4-30

<160> 4

<210> 1

<211> 777

<212> PRT

<213> Brassica juncea

<400> 1

Met Ala Pro Pro Ser Val Ile Lys Ser Asp Ala Ala Val Asn Gly Ile

5

10

15

Asp Leu Ser Gly Lys Pro Leu Phe Arg Leu Glu Gly Ser Asp Leu Leu

20

25

30

Ala Asn Gly His Val Val Leu Thr Asp Val Pro Val Asn Val Thr Val

35

40

45

Thr Ala Ser Pro Tyr Leu Ala Asp Lys Asp Gly Glu Pro Val Asp Ala

50

55

60

Ser Ala Gly Ser Phe Ile Gly Phe Asn Leu Asp Gly Glu Pro Arg Ser

65	70	75	80
Arg His Val Ala Ser Ile Gly Lys Leu Arg Asp Ile Arg Phe Met Ser			
	85	90	95
Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val Gly Ser Lys			
	100	105	110
Gly Ser Asp Ile Glu Asn Glu Thr Gln Ile Ile Ile Leu Glu Asn Ser			
	115	120	125
Gly Ser Gly Arg Pro Tyr Val Leu Leu Leu Pro Leu Leu Glu Gly Ser			
	130	135	140
Phe Arg Ser Ser Phe Gln Pro Gly Glu Asp Asp Asp Val Ala Val Cys			
145	150	155	160
Val Glu Ser Gly Ser Thr Gln Val Thr Gly Ser Glu Phe Arg Gln Val			
	165	170	175
Val Tyr Val His Ala Gly Asp Asp Pro Phe Lys Leu Val Lys Asp Ala			
	180	185	190
Met Lys Val Val Arg Val His Met Asn Thr Phe Lys Leu Leu Glu Glu			
	195	200	205
Lys Thr Pro Pro Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp			
	210	215	220
Ala Phe Tyr Leu Thr Val Asn Pro Asp Gly Val His Lys Gly Val Lys			
225	230	235	240
Cys Leu Val Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu Ile Asp Asp			
	245	250	255
Gly Trp Gln Ser Ile Gly His Asp Ser Asp Gly Ile Asp Val Glu Gly			
	260	265	270
Met Ser Cys Thr Val Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu Leu Lys			
	275	280	285
Phe Gln Glu Asn Phe Lys Phe Arg Asp Tyr Val Ser Pro Lys Asp Lys			
	290	295	300

Asn Glu Val Gly Met Lys Ala Phe Val Arg Asp Leu Lys Glu Glu Phe			
305	310	315	320
Ser Thr Val Asp Tyr Ile Tyr Val Trp His Ala Leu Cys Gly Tyr Trp			
	325	330	335
Gly Gly Leu Arg Pro Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ser Thr Ile Val			
	340	345	350
Arg Pro Glu Leu Ser Pro Gly Leu Lys Leu Thr Met Gln Asp Leu Ala			
	355	360	365
Val Asp Lys Ile Val Asp Thr Gly Ile Gly Phe Val Ser Pro Asp Met			
	370	375	380
Ala Asn Glu Phe Tyr Glu Gly Leu His Ser His Leu Gln Asn Val Gly			
385	390	395	400
Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Ile Leu Glu Met Leu Cys			
	405	410	415
Glu Lys Tyr Gly Gly Arg Val Asp Leu Ala Lys Ala Tyr Phe Lys Ala			
	420	425	430
Leu Thr Ser Ser Val Asn Lys His Phe Asp Gly Asn Gly Val Ile Ala			
	435	440	445
Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu Gly Thr Glu Ala Ile			
	450	455	460
Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp Pro Ser Gly			
465	470	475	480
Asp Ile Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val His Cys			
	485	490	495
Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln Pro Asp Trp Asp			
	500	505	510
Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala Ala Ser Arg			
	515	520	525
Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Ile Ser Asp Cys Val Gly Gln His			

530	535	540
Asp Phe Asp Leu Leu Lys Arg Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Ile Leu		
545	550	555
Arg Cys Glu His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Arg Leu Phe Glu Asp		560
565	570	575
Pro Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn Lys		
580	585	590
Tyr Thr Gly Ile Ile Gly Ala Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp Cys		
595	600	605
Arg Glu Thr Arg Arg Asn Gln Cys Phe Ser Gln Cys Val Asn Thr Leu		
610	615	620
Thr Ala Thr Thr Asn Pro Lys Asp Val Glu Trp Asn Ser Gly Asn Asn		
625	630	635
Pro Ile Ser Val Glu Asn Val Glu Glu Phe Ala Leu Phe Leu Ser Gln		
645	650	655
Ser Lys Lys Leu Val Leu Ser Gly Pro Asn Asp Asp Leu Glu Ile Thr		
660	665	670
Leu Glu Pro Phe Lys Phe Glu Leu Ile Thr Val Ser Pro Val Val Thr		
675	680	685
Ile Glu Gly Ser Ser Val Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn Met		
690	695	700
Leu Asn Thr Ser Gly Ala Ile Arg Ser Leu Val Tyr His Glu Glu Ser		
705	710	715
Val Glu Ile Gly Val Arg Gly Ala Gly Glu Phe Arg Val Tyr Ala Ser		
725	730	735
Arg Lys Pro Ala Ser Cys Lys Ile Asp Gly Glu Val Val Glu Phe Gly		
740	745	750
Tyr Glu Glu Ser Met Val Met Val Gln Val Pro Trp Ser Ala Pro Glu		
755	760	765

Gly Leu Ser Ser Ile Lys Tyr Glu Phe

770

775

777

<210> 2

<211> 2690

<212> DNA

<213> Brassica juncea

<220>

<221> CDS

<222> (134)...(2467)

<400> 2

accaatccaa aatctcatca aataatcgca attaggggaa gtttacaaga ttcattcatct 60

ccgttactat ataactacgc tcttcttccct tcgcctaacc caacttaacc taaaaaccac 120

tctatcagcg aaa atg gct cca ccg agc gta att aaa tcc gat gct gca 169

Met Ala Pro Pro Ser Val Ile Lys Ser Asp Ala Ala

5

10

gtc aac ggc att gac ctc tcc gga aag ccg ctt ttc cgg cta gag ggt 217

Val Asn Gly Ile Asp Leu Ser Gly Lys Pro Leu Phe Arg Leu Glu Gly

15

20

25

tcc gat ctc cta gcc aat ggt cac gtt gtc tta acc gat gta ccg gtt 265

Ser Asp Leu Leu Ala Asn Gly His Val Val Leu Thr Asp Val Pro Val

30

35

40

aac gtg act gtc act gct tca cct tac cta gct gac aaa gac gga gaa 313

Asn Val Thr Val Thr Ala Ser Pro Tyr Leu Ala Asp Lys Asp Gly Glu

45

50

55

60

ccg gtt gac gcc tcc gct ggt tca ttc atc ggg ttt aat ctc gac ggt 361

Pro Val Asp Ala Ser Ala Gly Ser Phe Ile Gly Phe Asn Leu Asp Gly

65	70	75	
gag cca cga agc cgc cac gtg gcg tcc atc ggt aaa ctc agg gat att			409
Glu Pro Arg Ser Arg His Val Ala Ser Ile Gly Lys Leu Arg Asp Ile			
80	85	90	
cga ttc atg agc ata ttc cgt ttc aag gtt tgg tgg act act cac tgg			457
Arg Phe Met Ser Ile Phe Arg Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp			
95	100	105	
gtc ggt tcc aaa gga tcc gac atc gag aac gag acc cag atc atc atc			505
Val Gly Ser Lys Gly Ser Asp Ile Glu Asn Glu Thr Gln Ile Ile Ile			
110	115	120	
ctc gag aac tcc ggg tcg ggt cgt cct tat gtt ctt ctt ctg ccg ctt			553
Leu Glu Asn Ser Gly Ser Gly Arg Pro Tyr Val Leu Leu Leu Pro Leu			
125	130	135	140
ctt gaa ggc tct ttc cgt tca tcc ttt cag cct ggg gaa gac gat gac			601
Leu Glu Gly Ser Phe Arg Ser Ser Phe Gln Pro Gly Glu Asp Asp Asp			
145	150	155	
gtg gcg gtt tgt gtc gaa tcc ggg tcg acc cag gtg acc ggg tcg gag			649
Val Ala Val Cys Val Glu Ser Gly Ser Thr Gln Val Thr Gly Ser Glu			
160	165	170	
ttt cgt caa gtt gtg tat gtt cac gcc gga gac gat ccg ttc aag ctc			697
Phe Arg Gln Val Val Tyr Val His Ala Gly Asp Asp Pro Phe Lys Leu			
175	180	185	
gtg aaa gac gcg atg aag gtg gtt agg gtt cat atg aac acc ttc aag			745
Val Lys Asp Ala Met Lys Val Val Arg Val His Met Asn Thr Phe Lys			
190	195	200	
ctc ttg gaa gag aag acr ccg ccg gga atc gtc gat aag ttc ggg tgg			793
Leu Leu Glu Glu Lys Thr Pro Pro Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp			
205	210	215	220
tgc acg tgg gat gcg ttt tat ttg acg gtg aac cct gac gga gtt cat			841

Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Thr Val Asn Pro Asp Gly Val His	
225	230
aag ggt gtt aag tgt ctc gtc gac ggt ggt tgt ccg ccg gga ttg gtc	889
Lys Gly Val Lys Cys Leu Val Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val	
240	245
cta atc gac gac ggt tgg caa tcg att gga cat gac tcc gat ggt atc	937
Leu Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Gly His Asp Ser Asp Gly Ile	
255	260
gat gtt gaa ggg atg agt tgt acc gtc gcc ggg gag caa atg cct tgc	985
Asp Val Glu Gly Met Ser Cys Thr Val Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys	
270	275
agg ctt ctg aaa ttt caa gag aac ttc aag ttc aga gac tac gtc tct	1033
Arg Leu Leu Lys Phe Gln Glu Asn Phe Lys Phe Arg Asp Tyr Val Ser	
285	290
ccg aaa gac aaa aac gaa gtc ggg atg aaa gct ttc gtc aga gat ctg	1081
Pro Lys Asp Lys Asn Glu Val Gly Met Lys Ala Phe Val Arg Asp Leu	
305	310
aaa gaa gaa ttc tcc acc gtt gat tac atc tac gtc tgg cac gcg ctt	1129
Lys Glu Glu Phe Ser Thr Val Asp Tyr Ile Tyr Val Trp His Ala Leu	
320	325
tgc ggc tac tgg ggt ggt ctt cgt ccc gga gct cct act ctt ccg ccc	1177
Cys Gly Tyr Trp Gly Gly Leu Arg Pro Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro	
335	340
tca act att gtc cgg cca gag ctc tcg ccg ggg ctt aag ttg acg atg	1225
Ser Thr Ile Val Arg Pro Glu Leu Ser Pro Gly Leu Lys Leu Thr Met	
350	355
caa gat ctc gcc gtt gat aag att gtc gat acc gga atc gga ttc gtc	1273
Gln Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Val Asp Thr Gly Ile Gly Phe Val	
365	370
	375
	380

tcg ccg gac atg gcg aat gag ttt tac gaa ggt ctt cac tct cat ctt	1321
Ser Pro Asp Met Ala Asn Glu Phe Tyr Glu Gly Leu His Ser His Leu	
385 390 395	
caa aac gtc ggt att gac ggc gtt aaa gtt gac gtc atc cac ata ttg	1369
Gln Asn Val Gly Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Ile Leu	
400 405 410	
gag atg ttg tgc gag aaa tat ggc ggg aga gta gac ttg gct aaa gct	1417
Glu Met Leu Cys Glu Lys Tyr Gly Gly Arg Val Asp Leu Ala Lys Ala	
415 420 425	
tac ttc aag gcg tta act tcc tca gtg aat aag cat ttt gac ggt aac	1465
Tyr Phe Lys Ala Leu Thr Ser Ser Val Asn Lys His Phe Asp Gly Asn	
430 435 440	
ggc gtt atc gct agc atg gag cac tgt aat gat ttc atg ttc ctt gga	1513
Gly Val Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu Gly	
445 450 455 460	
acc gaa gcc atc tct cta ggt cgt gtc ggt gat gac ttt tgg tgc acg	1561
Thr Glu Ala Ile Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr	
465 470 475	
gat cca tca ggc gac ata aac ggc aca tat tgg ctg caa gga tgc cac	1609
Asp Pro Ser Gly Asp Ile Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His	
480 485 490	
atg gtc cac tgt gcc tac aac agt ctt tgg atg gga aat ttc atc cag	1657
Met Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln	
495 500 505	
cct gat tgg gac atg ttt cag tcc aca cat cct tgt gct gag ttc cat	1705
Pro Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His	
510 515 520	
gct gct tct cgt gcc atc tcc ggt ggg ccc att tac atc agc gat tgt	1753
Ala Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Ile Ser Asp Cys	

525	530	535	540	
gtg ggc cag cac gat ttc gat ctc ttg aag cga ctc gtc ttg cct gac				1801
Val Gly Gln His Asp Phe Asp Leu Leu Lys Arg Leu Val Leu Pro Asp				
	545	550	555	
	ggt tgc att ttg agg tgt gag cac tat gca ctc cca act cgt gac cgt			1849
	Gly Ser Ile Leu Arg Cys Glu His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Arg			
	560	565	570	
	ctc ttt gaa gac cct ctt cat gat ggc aaa acc atg ctc aag att tgg			1897
	Leu Phe Glu Asp Pro Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp			
	575	580	585	
	aac ttg aac aag tac act gga att att gga gca ttc aac tgc caa gga			1945
	Asn Leu Asn Lys Tyr Thr Gly Ile Ile Gly Ala Phe Asn Cys Gln Gly			
	590	595	600	
	gga gga tgg tgc aga gaa acc cga cgc aac caa tgc ttc tcc caa tgc			1993
	Gly Gly Trp Cys Arg Glu Thr Arg Arg Asn Gln Cys Phe Ser Gln Cys			
605	610	615	620	
ggt aac acg tta acc gcc aca aca aat cct aag gac gtt gaa tgg aac				2041
Val Asn Thr Leu Thr Ala Thr Thr Asn Pro Lys Asp Val Glu Trp Asn				
	625	630	635	
	agt ggg aac aac cca atc tcc gtt gaa aac gtt gaa gag ttt gct ttg			2089
	Ser Gly Asn Asn Pro Ile Ser Val Glu Asn Val Glu Glu Phe Ala Leu			
	640	645	650	
	ttc ttg tct cag tct aag aag ctt gtg ttg tct gga cca aac gat gat			2137
	Phe Leu Ser Gln Ser Lys Lys Leu Val Leu Ser Gly Pro Asn Asp Asp			
	655	660	665	
	ctc gag atc act ttg gag cct ttc aag ttt gag cta atc act gtc tca			2185
	Leu Glu Ile Thr Leu Glu Pro Phe Lys Phe Glu Leu Ile Thr Val Ser			
	670	675	680	
	cca gtt gtc act att gag ggt agt tgc gtt cag ttt gct cca atc gga			2233

Pro Val Val Thr Ile Glu Gly Ser Ser Val Gln Phe Ala Pro Ile Gly
685 690 695 700
ttg gtt aac atg cta aac act agc ggt gca att cga tcc ttg gtg tat 2281
Leu Val Asn Met Leu Asn Thr Ser Gly Ala Ile Arg Ser Leu Val Tyr
 705 710 715
cat gag gaa tcc gtt gag att gga gtt cgt ggt gct gga gag ttc agg 2329
His Glu Glu Ser Val Glu Ile Gly Val Arg Gly Ala Gly Glu Phe Arg
 720 725 730
gtt tat gca tca agg aaa cct gcg agc tgc aaa att gat ggt gaa gtt 2377
Val Tyr Ala Ser Arg Lys Pro Ala Ser Cys Lys Ile Asp Gly Glu Val
 735 740 745
gtt gag ttt gga tac gaa gag tca atg gtg atg gtt caa gtg cct tgg 2425
Val Glu Phe Gly Tyr Glu Glu Ser Met Val Met Val Gln Val Pro Trp
 750 755 760
tct gca ccc gag ggt ttg tct tct att aag tat gag ttt tag agtttccga 2476
Ser Ala Pro Glu Gly Leu Ser Ser Ile Lys Tyr Glu Phe
765 770 775
aggtgcttat ttgtatcctt ctaaactcct taattatgag ctccgtgccg tttctttttc 2536
tatatgggttt ctgagagtga acatctaata tttaccact aggggtataat tattggcttt 2596
taagtgattt gtttttgaac tgtttttagt ggtgtaattt gtactgcccc tattattttt 2656
catatttatt tgtgaaagat aaaaaaaaaa aaaa 2690

<210> 3

<211> 577

<212> PRT

<213> Brassica napus

<400> 3

Leu Glu Glu Lys Thr Pro Pro Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys

	5		10		15
Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Thr Val Asn Pro Asp Gly Val His Lys					
	20		25		30
Gly Val Lys Cys Leu Val Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu					
	35		40		45
Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Gly His Asp Ser Asp Gly Ile Asp					
	50		55		60
Val Glu Gly Met Ser Cys Thr Val Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg					
	65		70		75
Leu Pro Lys Phe Gln Glu Asn Phe Lys Phe Arg Asp Tyr Val Ser Pro					
		85		90	
Lys Asp Lys Asn Glu Val Gly Met Lys Ala Phe Val Arg Asp Leu Lys					
	100		105		110
Glu Glu Phe Ser Thr Val Asp Tyr Ile Tyr Val Trp His Ala Leu Cys					
	115		120		125
Gly Tyr Trp Gly Gly Leu Arg Pro Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ser					
	130		135		140
Thr Ile Val Arg Pro Glu Leu Ser Pro Gly Leu Lys Leu Thr Met Gln					
	145		150		155
Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Ile Asp Thr Gly Ile Gly Phe Val Ser					
		165		170	
Pro Asp Met Ala Asn Glu Phe Tyr Glu Gly Leu His Ser His Leu Gln					
	180		185		190
Asn Val Gly Ile Asn Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Ile Leu Glu					
	195		200		205
Met Leu Cys Glu Lys Tyr Gly Gly Arg Val Asp Leu Ala Lys Ala Tyr					
	210		215		220
Phe Lys Ala Leu Thr Ser Ser Val Asn Lys His Phe Asp Gly Asn Ala					
	225		230		235
					240

Val Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu Gly Thr			
245	250	255	
Glu Ala Ile Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp			
260	265	270	
Pro Ser Gly Asp Ile Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met			
275	280	285	
Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln Pro			
290	295	300	
Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala			
305	310	315	320
Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Ile Ser Asp Cys Val			
325	330	335	
Gly Gln His Asp Phe Asp Leu Leu Arg Arg Leu Val Leu Pro Asp Gly			
340	345	350	
Ser Ile Leu Arg Cys Glu Tyr Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Arg Leu			
355	360	365	
Phe Glu Asp Pro Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn			
370	375	380	
Leu Asn Lys Tyr Thr Gly Ile Ile Gly Ala Phe Asn Cys Gln Gly Gly			
385	390	395	400
Gly Trp Cys Arg Glu Thr Arg Arg Asp Gln Cys Phe Ser Gln Cys Val			
405	410	415	
Asn Thr Leu Thr Ala Thr Thr Asn Pro Asn Asp Val Glu Trp Asn Ser			
420	425	430	
Gly Asn Asn Pro Ile Ser Ile Glu Asn Val Glu Glu Phe Ala Leu Phe			
435	440	445	
Leu Ser Gln Ser Lys Lys Leu Val Leu Ser Gly Gln Asn Asp Asp Leu			
450	455	460	
Glu Ile Thr Leu Glu Pro Phe Lys Phe Glu Leu Ile Thr Val Ser Pro			

465	470	475	480
Val Val Thr Ile Glu Gly Ser Ser Val Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu			
485	490	495	
Val Asn Met Leu Asn Thr Ser Gly Ala Ile Arg Ser Leu Val Tyr His			
500	505	510	
Glu Glu Ser Val Glu Ile Gly Val Arg Gly Ala Gly Glu Phe Arg Val			
515	520	525	
Tyr Ala Ser Lys Lys Pro Val Ser Cys Lys Ile Asp Gly Glu Asp Val			
530	535	540	
Glu Phe Gly Tyr Glu Glu Ser Met Val Met Val Gln Val Pro Trp Ser			
545	550	555	560
Ala Pro Glu Gly Leu Ser Ser Ile Lys Tyr Leu Phe			
565	570	572	

<210> 4

<211> 1762

<212> DNA

<213> Brassica napus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1719)

<400> 4

ttg gaa gaa aaa acg ccg ccg gga atc gtc gat aag ttc ggg tgg tgc	48	
Leu Glu Glu Lys Thr Pro Pro Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys		
5	10	15
acg tgg gat gcg ttt tat ttg acg gtg aac cct gac gga gtt cat aag	96	
Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Thr Val Asn Pro Asp Gly Val His Lys		

20	25	30	
ggt gtt aag tgt ctc gtc gac ggt ggt tgt ccg ccg gga ttg gtc cta			144
Gly Val Lys Cys Leu Val Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu			
35	40	45	
atc gac gac ggt tgg caa tcg att gga cat gac tcc gat ggt atc gat			192
Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Ile Gly His Asp Ser Asp Gly Ile Asp			
50	55	60	
ggt gaa ggg atg agt tgt acc gtc gcc ggg gag caa atg cct tgc agg			240
Val Glu Gly Met Ser Cys Thr Val Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg			
65	70	75	80
ctt ccg aaa ttt caa gag aac ttc aag ttc aga gac tac gtc tct ccg			288
Leu Pro Lys Phe Gln Glu Asn Phe Lys Phe Arg Asp Tyr Val Ser Pro			
85	90	95	
aaa gac aaa aac gaa gtc ggg atg aaa gct ttc gtc aga gat ctg aaa			336
Lys Asp Lys Asn Glu Val Gly Met Lys Ala Phe Val Arg Asp Leu Lys			
100	105	110	
gaa gaa ttc tcc acc gtt gat tac atc tac gtc tgg cac gcg ctt tgc			384
Glu Glu Phe Ser Thr Val Asp Tyr Ile Tyr Val Trp His Ala Leu Cys			
115	120	125	
ggy tac tgg gdw ggt ctt cgt ccc gga gct cct act ctt ccg ccs tcr			432
Gly Tyr Trp Gly Gly Leu Arg Pro Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ser			
130	135	140	
act att gtc cgr cca gag ctc tcg ccg ggg ctt aag ttg acg atg caa			480
Thr Ile Val Arg Pro Glu Leu Ser Pro Gly Leu Lys Leu Thr Met Gln			
145	150	155	160
gat ctc gcc gtt gat aag atc atc gat acc gga atc gga ttc gtc tcg			528
Asp Leu Ala Val Asp Lys Ile Ile Asp Thr Gly Ile Gly Phe Val Ser			
165	170	175	
ccg gac atg gcg aac gag ttt tac gaa ggt ctt cac tct cat ctt caa			576

Pro Asp Met Ala Asn Glu Phe Tyr Glu Gly Leu His Ser His Leu Gln	
180 185 190	
aac gtc ggc att aac ggc gtt aaa gtt gac gtt atc cac ata ctg gag	624
Asn Val Gly Ile Asn Gly Val Lys Val Asp Val Ile His Ile Leu Glu	
195 200 205	
atg ttg tgc gag aaa tat ggc ggg aga gtt gac ttg gct aaa gct tac	672
Met Leu Cys Glu Lys Tyr Gly Gly Arg Val Asp Leu Ala Lys Ala Tyr	
210 215 220	
ttc aag gcg tta acg tcg tca gtg aat aag cat ttt gac ggc aac gcc	720
Phe Lys Ala Leu Thr Ser Ser Val Asn Lys His Phe Asp Gly Asn Ala	
225 230 235 240	
gtt atc gcc agc atg gag cac tgt aat gac ttc atg ttc ctt gga acc	768
Val Ile Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu Gly Thr	
245 250 255	
gaa gcc atc tct cta ggt cgt gtc ggt gat gac ttt tgg tgc acg gat	816
Glu Ala Ile Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp	
260 265 270	
cca tct ggc gac att aac ggc acg tat tgg ctg caa gga tgt cac atg	864
Pro Ser Gly Asp Ile Asn Gly Thr Tyr Trp Leu Gln Gly Cys His Met	
275 280 285	
gtc cac tgt gcc tac aac agt ctt tgg atg gga aat ttc atc cag cct	912
Val His Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile Gln Pro	
290 295 300	
gat tgg gac atg ttt cag tcc aca cat cct tgt gct gag ttc cat gct	960
Asp Trp Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Glu Phe His Ala	
305 310 315 320	
gct tca cgt gcc atc tcc ggt ggg ccc att tac atc agc gat tgt gtg	1008
Ala Ser Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Ile Ser Asp Cys Val	
325 330 335	

ggc cag cac gat ttc gat ctc ttg agg aga ctc gtt ttg cct gac ggt	1056
Gly Gln His Asp Phe Asp Leu Leu Arg Arg Leu Val Leu Pro Asp Gly	
340 345 350	
tcg att ttg agg tgt gag tac tat gct ctc cca act cgt gac cgt ctc	1104
Ser Ile Leu Arg Cys Glu Tyr Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Arg Leu	
355 360 365	
ttt gaa gac cct ctt cat gat ggc aaa acc atg ctc aag att tgg aac	1152
Phe Glu Asp Pro Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn	
370 375 380	
ttg aac aag tac act gga atc atc gga gca ttc aac tgt caa gga gga	1200
Leu Asn Lys Tyr Thr Gly Ile Ile Gly Ala Phe Asn Cys Gln Gly Gly	
385 390 395 400	
gga tgg tgc aga gaa act cga cgc gac caa tgc ttc tcc caa tgc gtt	1248
Gly Trp Cys Arg Glu Thr Arg Arg Asp Gln Cys Phe Ser Gln Cys Val	
405 410 415	
aac acg tta acc gcc aca aca aat cct aat gac gtt gaa tgg aac agt	1296
Asn Thr Leu Thr Ala Thr Thr Asn Pro Asn Asp Val Glu Trp Asn Ser	
420 425 430	
ggg aac aac ccg atc tcc att gaa aac gtt gaa gag ttt gct ttg ttc	1344
Gly Asn Asn Pro Ile Ser Ile Glu Asn Val Glu Glu Phe Ala Leu Phe	
435 440 445	
ttg tct caa tcc aag aag ctt gtg ttg tcc ggg caa aac gat gat ctc	1392
Leu Ser Gln Ser Lys Lys Leu Val Leu Ser Gly Gln Asn Asp Asp Leu	
450 455 460	
gag atc aca tta gag ccc ttc aag ttc gag ctc atc act gtc tca cca	1440
Glu Ile Thr Leu Glu Pro Phe Lys Phe Glu Leu Ile Thr Val Ser Pro	
465 470 475 480	
gtt gtc acc att gag ggc agt tcg gtt cag ttt gct cca atc gga ttg	1488
Val Val Thr Ile Glu Gly Ser Ser Val Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu	

485	490	495	
ggt aac atg ctt aac act agc ggt gcg att cga tcc ttg gtt tat cat			1536
Val Asn Met Leu Asn Thr Ser Gly Ala Ile Arg Ser Leu Val Tyr His			
500	505	510	
gag gaa tcc gtt gag atc ggt gtt cgt ggt gct gga gaa ttc agg gtt			1584
Glu Glu Ser Val Glu Ile Gly Val Arg Gly Ala Gly Glu Phe Arg Val			
515	520	525	
tat gca tcg aag aaa cct gtg agc tgc aag att gat ggt gaa gat gtt			1632
Tyr Ala Ser Lys Lys Pro Val Ser Cys Lys Ile Asp Gly Glu Asp Val			
530	535	540	
gag ttt ggg tac gaa gag tca atg gtg atg gtt caa gtg cct tgg tct			1680
Glu Phe Gly Tyr Glu Glu Ser Met Val Met Val Gln Val Pro Trp Ser			
545	550	555	560
gca cca gag ggt ttg tct tct att aag tat ttg ttt tag agttatttaa			1729
Ala Pro Glu Gly Leu Ser Ser Ile Lys Tyr Leu Phe			
565	570		
ggtgcttaat tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa			1762

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、塩基配列にコードされるアミノ酸の対応を示すコドン表である。コドンは、5'-末端が左側にくるように示し、mRNAにおける塩基配列を示している。UはRNAにおけるウラシル塩基を示しており、DNAにおいてはチミン塩基に相当する。

【書類名】

図面

【図 1】

Phe	UUU	Ser	UCU	Tyr	UAU	Cys	UGU
	UUC		UCC		UAC		UGC
Leu	UUA	Pro	UCA	Stop	UAA	Stop	UGA
	UUG		UCG		UAG		UGG
	CUU		CCU	His	CAU	Arg	CGU
	CUC		CCC		CAC		CGC
Ile	CUA	Thr	CCA	Gln	CAA		CGA
	CUG		CCG		CAG		CGG
Met	AUU	Val	ACU	Asn	AAU	Ser	AGU
	AUC		ACC		AAC		AGC
Val	AUA	Ala	ACA	Lys	AAA	Arg	AGA
	AUG		ACG		AAG		AGG
	GUU		GCU	Asp	GAU	Gly	GGU
	GUC		GCC		GAC		GGC
	GUA		GCA	Glu	GAA		GGA
	GUG		GCG		GAG		GGG

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

植物におけるラフィノース合成酵素の発現量や活性を変化させる技術に利用可能なラフィノース合成酵素遺伝子等を提供すること。

【解決手段】

配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号134から2467までの塩基で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有する蛋白質をコードするDNAからなるラフィノース合成酵素遺伝子。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成10年12月14日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 平成10年特許願第351246号
【補正をする者】
 【事件との関係】 特許出願人
 【識別番号】 000002093
 【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100093285
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 久保山 隆
【手続補正 1】
 【補正対象書類名】 明細書
 【補正対象項目名】 0006
 【補正方法】 変更
 【補正の内容】 1
【プルーフの要否】 要

【0006】

本発明遺伝子は、例えば、下記の方法により得ることができる。

例えば、カラシナ(*Brassica juncea*)、ナタネ(*Brassica napus*)等のアブラナ科植物の組織を液体窒素中で凍結させた後、乳鉢などを用いて物理的に磨砕することにより細かい粉末状の組織片とし、該組織片から通常の方法によりRNAを抽出する。該抽出操作には、市販のRNA抽出キットを利用することができる。得られたRNA抽出液からエタノール沈澱によりRNAを回収し、このRNAから通常の方法によりポリA鎖を有するRNAを分画する。該分画操作には、市販のOligo dTカラムを利用することができる。このようにして得られたポリA鎖を有するRNAから通常の方法によりcDNAを合成する。該合成操作には、市販のcDNA合成キットを利用することができる。前記cDNAを鋳型として、配列番号2で示される塩基配列を基にして設計され化学合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCRを行なうことにより、DNAを増幅する。例えば、カラシナ(*Brassica juncea*)由来のcDNAを鋳型として、例えば、下記リスト1に示されるプライマー3と4を用いてPCRを行うことにより、本発明遺伝子である「配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子」、より具体的には「配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号1から2654までの塩基で表される塩基配列からなるラフィノース合成酵素遺伝子」のcDNAを増幅し取得することができる。この際に用いられるプライマーは、目的に応じて配列番号2で示される塩基配列を基にして設計し合成することができ、例えば、「配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子」のオープンリーディングフレーム領域をコードするDNA、すなわち「配列番号2で示される塩基配列のうち塩基番号134から2467までの塩基で表される塩基配列からなるラフィノース合成酵素遺伝子」のDNA（以下、本DNAと記す。）を増幅するには、下記リスト1のプライマー5と6で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成しプライマーに用いるとよい。

増幅されたDNAは「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載さ

れる通常の方法に準じてサブクローニングすることができる。具体的には、例えば、Invitrogen社のTAクローニングキットやStratagene社のpBluescriptIIなどのプラスミドベクターを用いてクローニングしてもよい。クローニングされたDNAの塩基配列の確認は、F.Sanger, S.Nicklen, A.R.Coulson著、Proceedings of National Academy of Science U.S.A. (1977), 74, 5463頁-5467頁等に記載されるダイデオキシターミネーティング法により行なうことができる。例えば、市販のパーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitなどを利用するとよい。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名 住友化学工業株式会社